

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian seperti: preparasi alat, persiapan bahan, isolasi dan karakterisasi sifat fisik minyak atsiri dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya (FMIPA UB). Analisis minyak atsiri menggunakan KG-SM dilakukan di UPT Instrumentasi, Jurusan Kimia, FMIPA UB. Penentuan indeks bias minyak atsiri adas dilakukan di Laboratorium Fisika Dasar, Jurusan Fisika, FMIPA UB. Uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FK UB). Determinasi terhadap biji adas manis dilakukan di UPT Materia Medica, Batu. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari hingga Juni 2017.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat distilasi uap (gambar disajikan pada Lampian D.2.), kompor listrik, botol semprot, pompa air beserta selang, erlenmeyer kapasitas 25 mL, botol penampung distilat, corong gelas, mortar; *pestle*, pipet tetes, spatula *stainless steel*, cawan porselen, piknometer kapasitas 1 mL, vial kapasitas 5 mL, tabung reaksi kapasitas 16x150 mm, jarum ose, cawan petri, mikropipet kapasitas 100 μ L, dan *cotton swab*.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain biji adas manis kering yang diperoleh dari Toko Jamu di kota Malang, akuades, es, batu didih, magnesium sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), gas nitrogen (N_2), media padat (*nutrient agar*), media cair (*nutrient broth*), larutan natrium klorida (NaCl), cakram (*blanc disk*) dan cakram sefoksitin.

3.2.3 Bakteri uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, FK UB.

3.2.4 Instrumentasi

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM) (merek Shimadzu QP2010S), neraca digital (merek Sartorius BSA2245-CW), Spektrofotometer (merek Smart Spec Plus), Vortex mixer (tipe V-1000), Inkubator (merek WTB-Binder), dan refraktometer (merek Abbe Bellingham and Stanley).

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan (diagram alir penelitian disajikan pada Lampiran A.1.) adalah sebagai berikut :

1. Preparasi alat dan persiapan bahan penelitian.
2. Determinasi sampel biji adas manis.
3. Pembuatan MgSO_4 anhidrat dari $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
4. Isolasi minyak atsiri biji adas manis menggunakan distilasi uap selama 5, 7, dan 9 jam.
5. Karakterisasi sifat fisik minyak atsiri biji adas manis berdasarkan wujud, warna, aroma, penentuan berat jenis, dan indeks bias.
6. Identifikasi profil komponen minyak atsiri biji adas manis.
7. Uji antibakteri *S. aureus* minyak atsiri biji adas manis menggunakan metode difusi cakram.
8. Analisis data yang meliputi persen rendemen, karakteristik sifat fisik, profil komponen dan aktivitas antibakteri minyak atsiri biji adas manis.

3.4 Prosedur Kerja Penelitian

3.4.1. Preparasi alat dan persiapan bahan penelitian

Preparasi alat dilakukan dengan cara set peralatan distilasi dirangkai kemudian ketel uap dipanaskan dan dites kebocoran serta dilakukan percobaan pendahuluan. Bahan berupa biji adas manis yang diperoleh dari Toko Jamu di kota Malang disiapkan dengan ditimbang sebanyak 250 g, sebagian dideterminasi dan sisanya disimpan dalam wadah kaca tertutup (tidak terkena sinar matahari).

3.4.2. Determinasi biji adas manis

Determinasi terhadap biji adas manis dilakukan di UPT Materia Medica Batu. (Surat keterangan hasil determinasi disajikan pada Lampiran D.1.)

3.4.3. Pembuatan MgSO_4 anhidrat dari $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

MgSO_4 anhidrat disiapkan dengan cara sebanyak 50 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ditimbang dalam cawan porselen kemudian dipanaskan dalam tanur dengan temperatur 300-350 °C selama 4 jam. Pemanasan selama 4 jam menghasilkan $\text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O}$. Cawan porselen berisi $\text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O}$ tersebut kemudian dидiamkan sebentar, lalu dimasukkan ke dalam desikator selama 1 jam. Selanjutnya cawan berisi $\text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O}$ tersebut diambil dari desikator dan ditimbang. Bongkahan $\text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O}$ dituangkan ke dalam mortar dan digerus dengan *pestle* hingga halus. Serbuk halus $\text{MgSO}_4 \cdot (7-x)\text{H}_2\text{O}$ tersebut dituangkan pada cawan porselen kemudian dipanaskan dalam tanur pada temperatur 300-350 °C selama 1 jam. Serbuk tersebut selanjutnya dидiamkan sebentar lalu dimasukkan ke desikator selama 1 jam, kemudian ditimbang dan dicatat massanya. Serbuk digerus ulang, lalu dituangkan pada cawan porselen. Proses pemanasan pada temperatur 300-350 °C selama 1 jam diulang hingga diperoleh massa konstan. Massa MgSO_4 hasil pemanasan dicatat, data disajikan pada Tabel B.1. Skema kerja pembuatan MgSO_4 anhidrat disajikan pada Lampiran A.2.

3.4.4 Isolasi minyak atsiri biji adas manis

Isolasi minyak atsiri biji adas manis dilakukan menggunakan metode distilasi uap. Langkah pertama yang dilakukan adalah set peralatan distilasi uap dirangkai seperti pada Lampiran D.2. Selanjutnya ketel uap diisi air hingga 2/3 volume dan dipanaskan hingga mendidih. Sementara itu, biji adas manis ditimbang sebanyak 250 g dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat leher tiga kapasitas 1 L yang telah tersambung dengan rangkaian alat distilasi uap. Beberapa butir batu didih dimasukkan diantara biji adas manis dalam labu alas bulat leher tiga tersebut kemudian labu ditutup rapat. Uap air dari ketel uap yang telah mendidih dialirkan menuju labu alas bulat. Pompa sirkulasi air yang diletakkan dalam ember berisi air dan es dinyalakan sehingga terjadi sirkulasi air pada kondensor. Proses distilasi uap dilakukan selama 5 jam. Distilat yang terbentuk

ditampung dalam corong pisah 500 mL. Waktu distilasi dimulai saat terbentuk tetesan pertama.

Distilat didiamkan hingga terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan minyak atsiri biji adas manis. Lapisan air tersebut dipisahkan dari lapisan minyak dengan menampung lapisan air dalam botol penampung. Lapisan minyak dalam corong pisah dimasukkan ke dalam erlenmeyer 25 mL dan ditutup rapat. Serbuk MgSO_4 anhidrat dimasukkan ke dalam erlenmeyer 25 mL berisi minyak sedikit demi sedikit sambil erlenmeyer digoyang perlahan. Penambahan MgSO_4 anhidrat dihentikan apabila sudah tidak terbentuk bongkahan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Sisa serbuk MgSO_4 anhidrat ditimbang, selisih penimbangan menunjukkan jumlah MgSO_4 anhidrat yang digunakan dalam proses penyerapan molekul H_2O dari minyak atsiri. Massa MgSO_4 anhidrat yang ditambahkan pada minyak atsiri biji adas manis dicatat massanya. Selanjutnya pemisahan minyak atsiri dari $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilakukan dengan cara dekantasi. Minyak dituangkan ke dalam vial kapasitas 5 mL. Kemudian permukaan minyak atsiri dalam vial dialiri dengan gas N_2 dan ditutup rapat. Minyak atsiri biji adas manis disimpan dengan kondisi botol vial dibungkus aluminium foil dalam lemari pendingin untuk analisis selanjutnya. Prosedur yang sama seperti yang diuraikan di atas dilakukan pada distilasi uap selama 7 jam dan 9 jam. Skema kerja isolasi minyak atsiri biji adas manis disajikan pada Lampiran A.3.

3.4.5. Karakterisasi sifat fisik minyak atsiri biji adas manis

Karakterisasi sifat fisik minyak atsiri biji adas manis yang diperoleh dilakukan berdasarkan wujud, warna, aroma, penentuan berat jenis dan indeks bias.

a. Karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan wujud, warna, dan aroma minyak atsiri biji adas manis

Karakterisasi sifat fisik terhadap wujud dan warna dilakukan melalui pengamatan secara visual (mata). Aroma ditentukan secara organoleptik (pembau) dengan membandingkan aroma minyak atsiri biji adas manis dan biji adas manis yang digunakan. Data sifat fisik minyak atsiri berdasarkan wujud, warna, dan aroma disajikan pada Tabel 4.2.

- b. Karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan berat jenis minyak atsiri biji adas manis

Berat jenis minyak atsiri biji adas manis ditentukan menggunakan piknometer kapasitas 1 mL. Piknometer yang digunakan belum dikalibrasi sehingga piknometer kosong tersebut ditimbang dan dicatat massanya. Selanjutnya akuades dipipet menggunakan pipet ukur 5 mL sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam piknometer, kemudian ditimbang dan dicatat massanya. Meniskus akuades volume 1 mL tersebut diberi tanda batas. Apabila penimbangan menunjukkan massa air 1 mL adalah 1 g, maka piknometer tersebut telah dikalibrasi. Kemudian akuades dikeluarkan dari piknometer tersebut dan dikeringkan. Selanjutnya, minyak atsiri biji adas manis dimasukkan ke dalam piknometer yang telah dikalibrasi dengan volume hingga tanda batas kemudian ditimbang dan dicatat massanya. Temperatur pada saat penimbangan dicatat. Berat jenis minyak adas dihitung dengan rumus seperti pada Lampiran C.4. Data perhitungan disajikan pada Lampiran C.4.1., perhitungan koreksi disajikan Lampiran C.4.2.

- c. Karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan indeks bias minyak atsiri biji adas manis

Indeks bias minyak atsiri biji adas manis diukur menggunakan refraktometer Abbe. Refraktometer disambungkan pada sumber listrik dan dinyalakan, kemudian tempat sampel dibuka dan dibersihkan dengan cara meneteskan akuades dan dikeringkan menggunakan tisu. Apabila sudah bersih dan kering, sebanyak 3 tetes minyak atsiri biji adas manis diteteskan pada tempat sampel kemudian ditutup. Knop pengatur skala diputar sambil dilakukan pengamatan hingga menunjukkan perbedaan gelap dan terang yang sama. Skala yang terukur dibaca dan dicatat sebagai indeks bias minyak adas manis. Temperatur termometer (28 °C) pada refraktomer dicatat sebagai temperatur pengukuran. Hasil dan data perhitungan koreksi disajikan pada Lampiran C.3.

3.4.6. Analisis komponen minyak atsiri biji adas manis

Analisis komponen minyak biji adas manis hasil distilasi uap dilakukan dengan menginjeksikan minyak biji adas manis sebanyak 0,2 μL menggunakan siring Hamilton pada *injector port* instrumen KG-SM dengan kondisi operasional sebagai berikut :

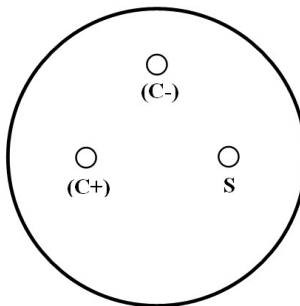
Jenis kolom	: Restek Rtx-5MS
Fasa diam	: 5% difenil/95% dimetil polisiloksan
Panjang kolom	: 30 meter
Temperatur kolom	: 70-215 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}$ /menit)
Temperatur injektor	: 215 $^{\circ}\text{C}$
Tekanan gas	: 12,9 kPa
Kecepatan aliran gas	: 3 mL/menit
Split ratio	: 158,4
Gas pembawa	: He
Jenis pengion	: EI 70 eV

Data hasil analisis menggunakan instrumen KG-SM adalah TIC dan spektra massa. Jumlah puncak dan kadar komponen pada TIC digunakan untuk menentukan jumlah komponen minyak adas manis. TIC minyak atsiri biji adas manis 5, 7, dan 9 jam berturut-turut disajikan pada Gambar 4.4, 4.5, dan 4.6. Spektra massa digunakan untuk menentukan jenis atau struktur komponen minyak biji adas manis yang dapat dibandingkan dengan spektra standar dari pustaka WILEY7.LIB. Spektra massa komponen minyak atsiri biji adas manis disajikan pada Lampiran E.

3.4.7. Uji aktivitas antibakteri *S. aureus* minyak atsiri biji adas manis

Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri biji adas manis dilakukan menggunakan metode difusi cakram, dengan kertas cakram berdiameter 6 mm. Sejumlah koloni bakteri *S. aureus* dicuplik dari tabung biakan ke dalam media cair pada tabung reaksi kapasitas 16x150 mm menggunakan jarum ose, kemudian diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator pada temperatur 37 $^{\circ}\text{C}$. Komponen media cair yang digunakan untuk pembiakan bakteri disajikan pada Lampiran B.2. Hasil inkubasi tersebut diukur nilai absorbansinya menggunakan instrumen spektrofotometer yaitu sebesar 0,81. Koloni bakteri *S. aureus* selanjutnya diambil sebanyak 0,8 mL untuk diencerkan dengan larutan NaCl hingga diperoleh nilai absorbansi 0,1. Media padat disiapkan kemudian dituang pada cawan

petri dan didinginkan. Komponen media padat untuk biakan bakteri disajikan pada Lampiran B.3. Suspensi bakteri *S. aureus* dihomogenkan menggunakan vortex dan diinokulasi (*spreading*) di permukaan media padat pada cawan petri secara menyeluruh menggunakan *cotton swab*. Cawan petri yang digunakan mempunyai diameter 90 mm. Cakram (*blank disc*) dan cakram antibiotik sefoksitin sebagai kontrol positif (C+) diletakkan pada permukaan bakteri sesuai *template* posisi cakram. *Template* posisi cakram pada cawan petri disajikan pada Gambar 3.1. Kemudian sebanyak 15 μL minyak atsiri (S) diteteskan pada permukaan media cakram. Akuades diteteskan sebagai kontrol negatif (C-) sebanyak 15 μL pada cakram. Kemudian inkubasi dilakukan pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk diamati dan diameternya diukur sebagai daya hambat dengan satuan milimeter. Hasil pengukuran diameter zona hambat disajikan pada Tabel 4.8.



Gambar 3.1. *Template* posisi cakram

